

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 2000083666  
PUBLICATION DATE : 28-03-00

APPLICATION DATE : 14-07-99  
APPLICATION NUMBER : 11200090

APPLICANT : NIPPON PAPER INDUSTRIES CO LTD;

INVENTOR : EBINUMA HIROYASU;

INT.CL. : C12N 15/09 A01H 1/00 C12N 5/10

TITLE : VECTOR OF IMPROVED REDIFFERENTIATION EFFICIENCY FOR TRANSDUCING GENE INTO PLANT

ABSTRACT : PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject novel vector, containing a target gene, and cytokinin-and auxin-synthesis genes as the selected marker genes, and useful for transducing the target gene into a plant by a genetic engineering procedure to obtain the transformed plant.

SOLUTION: This novel vector, containing a target gene, and cytokinin- and auxin-synthesis genes as the selected marker genes, is for transducing a gene into a plant, and useful for transducing the target gene into a plant by a genetic engineering procedure to obtain the transformed plant, and efficiently inducing redifferentiation from the plant tissues into which the gene is transduced. This vector contains the target gene, cytokinin- and auxin-synthesis genes as the selected marker genes and a DNA factor having elimination ability, wherein the selected marker genes are located at a position at which they exhibit the same behavior as the DNA factor, and the target gene is located at a position at which it does not exhibits the same behavior as the DNA factor.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 目的遺伝子、並びに選抜マーカー遺伝子としてサイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子を含むことを特徴とする、植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項2】 目的遺伝子、選抜マーカー遺伝子としてサイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子、並びに脱離能を有するDNA因子を含み、かつ、サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子はこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に存在し、また目的遺伝子は、この脱離能を有するDNA因子とは挙動を一つにすることからい位置に存在する、植物への遺伝子導入用ベクター

【請求項3】 サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子が脱離能を有するDNA因子の内部に存在する、請求項2に記載の植物への遺伝子導入用ベクター

【請求項4】 脱離能を有するDNA因子が部位特異的組換え系に由来するものである、請求項2または3に記載の植物への遺伝子導入用ベクター

【請求項5】 サイトカイニン合成遺伝子がアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のT-DNA上に存在する *i p l* (isopentenyl transferase) 遺伝子である、請求項1、2、3または4に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

【請求項6】 オーキシン合成遺伝子がアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のT-DNA上に存在する *i a a M* (tryptophan monooxygenase) / *i a a H* (indoleacetamide hydrolase) 遺伝子である、請求項1、2、3、4または5に記載の植物への遺伝子導入用ベクター。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子工学的手法により目的遺伝子を植物に導入して形質転換植物を得る際に有用な新規ベクターに関する。

## 【0002】

【従来の技術】 遺伝子工学技術を利用した微生物、培養細胞などの形質転換は、現在、医薬品として有用な生理活性物質の生産等の目的に応用され、実産業においても多大の貢献をなしている。植物育種の分野においては、植物細胞のライフサイクルが微生物等に比較して長いこと等の理由から、遺伝子工学技術の実産業への応用は遅れているが、この技術は、目的とする遺伝子を直接、育種の対象となる植物に導入することを可能とするため、(a) 改変すべき形質のみが導入できる、(b) 植物以外の種(微生物等)の形質も植物に導入できる、(c) 育種期間の大幅な短縮ができるなど、交配を重ねて行う古典的な育種と比べて多くのメリットを有し、その応用は、植物育種の飛躍的進歩をもたらすものと期待

され、またこの期待は現実のものとなりつつある。

【0003】 具体的に、目的遺伝子を対象植物に導入し、遺伝子導入植物を作成するには(1) 目的遺伝子の植物細胞への導入(染色体、核等に導入される場合も含む)、(2) 目的遺伝子が導入された細胞のみからなる植物組織の選抜、(3) 選抜された植物組織からの植物体の再生、の3段階を必ず経ることになる。また、このうち、目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては通常、選抜マーカー遺伝子を使用する。即ち、これを目的遺伝子と共に植物細胞へ導入し、その導入細胞、ひいてはこの細胞から生ずる組織が選抜マーカー遺伝子の発現によって示す特徴的な性質を、目的遺伝子導入の指標として用いるのが普通である。例えば、このような選抜マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性を付与するカナマイシン抵抗性遺伝子(NPTII; ネオマイシンリン酸化酵素遺伝子)やハイグロマイシン抵抗性遺伝子(HPT; ハイグロマイシンリン酸化酵素遺伝子)、アミノ酸合成に関与するノバリン合成酵素遺伝子(NOS)やオクトビン合成酵素遺伝子(OCS)、農薬耐性を付与するスルフォニルウレア系抵抗性遺伝子(ALS; アセトラクテート合成酵素遺伝子)などがある。

【0004】 しかし選抜マーカー遺伝子の発現はまた、このような遺伝子導入植物を食用等に供することを目的とした場合、重大な障害となる。つまり、かかる選抜マーカー遺伝子が発現することによって生ずる遺伝子産物の、人体への安全性を担保することが非常に困難だからである。従って、これら選抜マーカー遺伝子を指標として作成された遺伝子導入植物を食品として販売する場合には、その遺伝子産物の人体への影響について詳細な調査が必要とされる。例えば、NPTII遺伝子は、すでに1980年代前半から、選抜マーカー遺伝子として実験室レベルでは盛んに用いられて来たが、1994年になってようやく、その遺伝子産物が米国食品衛生局(FDA)により食品添加物として認可され、これを選抜マーカー遺伝子として用い、形質転換された遺伝子導入植物が食用等に供されるようになった。しかし、実際にこれを口にするようになる肝心の消費者レベルでは、このようなNPTII遺伝子産物への不安感は、依然として拭い去り難く存在し続けている。

【0005】 また現在、選抜マーカー遺伝子として実用化されているのは、このNPTII遺伝子をはじめ、植物細胞に対する生長阻害物質の解毒作用に寄与する遺伝子のみであり、それ故、目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては、これら生長阻害物質を含む培地でその培養を行い、選抜マーカー遺伝子の発現の有無、つまりはかかる物質に対する耐性を評価し、これを指標とすることになる。しかしこの場合、耐性がある、すなわちかかる物質の存在下で植物組織が増殖するといっても、これは程度の問題であり、このような阻害物質の存在下での培養が、植物細胞にとって好ましくぬ影響を与えることは

避け難く、現実には、植物細胞の活性低下に伴う遺伝子導入組織の増殖、再分化率の低下等の副作用が問題となっている。

【0006】さらに、遺伝子導入組織を選択した後においては、選抜マーカー遺伝子の発現は、植物育種を目的とする研究者のレベルにおいても、大きな障害を与える。すなわち、ある選抜マーカー遺伝子を用いて作成された遺伝子導入植物に対して、さらに別の遺伝子を新たに導入しようとする場合には、二度と、同一の選抜マーカー遺伝子を用いて遺伝子導入を行うことができない。すでに、対象となる植物には、この選抜マーカー遺伝子が存在しているため、再びこれを、新たな目的遺伝子と共にその同じ植物に導入しても、新たな目的遺伝子が導入されようがされまいが、その植物においてはこの選抜マーカー遺伝子が常に発現し、これを目的遺伝子導入の指標とすることは、もはやできないからである。従って、ある植物に対して遺伝子導入を繰り返すことができる数は、その植物に対して何種類の異なった選抜マーカー遺伝子を使用できるかによって、自ずから制約を受けることとなる。しかし、現在実用できる選抜マーカー遺伝子の種類はさして多くない。しかも、これらの選抜マーカー遺伝子全てが、対象となる植物に使用できるわけではないのである。

【0007】かかる問題を解決する手段として、本出願人は先に、特開平9-154580において、選抜マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子を有する新規なベクターを提供した。また、このベクターは、形態異常誘導遺伝子として特定の遺伝子を用いた場合には、これを用いて遺伝子導入が行われた一部の植物において、植物ホルモンを添加していない培地でもその組織を増殖、再分化させるなど、遺伝子導入個体の再分化効率を上昇させる効果も観察された。

【0008】しかしながら、他の多くの植物種においては、このような効果は観察されていない。遺伝子導入植物の作成において、遺伝子が導入された組織から植物の再分化を誘導する過程は非常に重要であり、この再分化効率の上昇は、遺伝子導入植物の作成効率上昇に直結すると考えられる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、選抜マーカー遺伝子として形態異常誘導遺伝子を有する植物への遺伝子導入用ベクターにおいて、これを用いて遺伝子導入が行われた植物組織からの再分化効率を上昇させることを目的として行われた。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明の目的は、選抜マーカー遺伝子である形態異常誘導遺伝子として、サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子を用いることにより達成される。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

【0012】サイトカイニン、オーキシンはいずれも植物ホルモンの一種である。一般に、高等植物においては、サイトカイニンは側芽の生長と細胞の分裂を促進し、オーキシンは細胞の伸長生長と分裂を促進する。高等植物の組織から植物体を再分化する過程、即ち、脱分化、増殖、分化という各ステージは、これらサイトカイニンとオーキシンによってコントロールされることが知られている。

【0013】本発明においては、上記二種の植物ホルモンの遺伝子であれば、いずれでも使用することができる。よく知られているのは、サイトカイニン合成遺伝子としては i p t (isopentenyl transferase) 遺伝子、オーキシン合成遺伝子としては i a a M (tryptophan monooxygenase) / i a a H (indoleacetamide hydrolase) 遺伝子であり、これらはいずれもアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*、以下、単に A. ツメファシエンスとする。) の T-DNA 上に存在する (A.C. Smigocki, L.D. Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5131, 1988、及び、D. Inze, M. Van Montagu, Mol. Gen. Genet., 194:265, 1984)。なお、i a a M 遺伝子及び i a a H 遺伝子は一つのプロモーターを共有する遺伝子であり、それぞれトリプトファンを酸化してインドールアセトアミドに変換する酵素トリプトファンモノオキシゲナーゼ (tryptophan monooxygenase)、及びこのインドールアセトアミドを加水分解してオーキシンであるインドール酢酸 (IAA: indole-3-acetic acid) に変換する酵素インドールアセトアミドヒドロラーゼ (indoleacetamide hydrolase) をコードしている。これらは植物ホルモンの遺伝子としては解析も進んでおり、当業者が容易に取得可能であることから、本発明において使用するサイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子として好ましい。

【0014】本発明のベクターを用いて植物細胞に目的遺伝子を導入すると、選抜マーカー遺伝子であるこれら植物ホルモン合成遺伝子の働きにより、目的遺伝子が導入された細胞からなる組織は不定芽を分化し、次いでこれは、頂芽優勢の崩れた無秩序な芽の集合体である多芽体を形成することとなる。従って、このようにして生じた多芽体は、遺伝子導入細胞のみからなっているため、この多芽体を肉眼で検出・選抜すればそれだけで、目的遺伝子が導入された細胞のみからなる組織を選択できることになる。なお、ここでベクターとは、外来遺伝子を宿主細胞に導入する目的に用いられる DNA 配列であって、この外来遺伝子を宿主細胞内で発現させるために必要な機能を備えているものを指し、外来遺伝子は多くの場合、これに組み込まれた形で宿主細胞に導入される。

【0015】すなわち本発明のベクターを用いて遺伝子導入を行えば、遺伝子導入後の細胞を MS 培地等の通常

の培地を用い、通常の培養条件で培養するだけで、目的遺伝子が導入された細胞のみからなる植物組織の内眼による選抜が可能となる。従って、その選抜にあたっては、植物細胞生長阻害物質等、遺伝子導入組織選抜のための特別な物質を使用する必要がないので、作業が簡略化されるばかりではなく、これらの影響により植物細胞の活性が低下するおそれもない。加えて、そもそもサイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子は、植物が本来保持しているか、あるいは細菌等の感染により植物に自然に導入されてきた遺伝子であるため、本発明のベクターを用いて植物への遺伝子導入を行い、かかる遺伝子が遺伝子導入を行った植物細胞内で発現したとしても、これを食用等に供した場合の人体への安全性は担保される。

【0016】本発明のベクターは、また、サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子を脱離能を有するDNA因子と組合せ、これらの植物ホルモン遺伝子を、脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に配置して用いてもよい。なお、この場合は、目的遺伝子を、脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにしない位置に配置することを要する。

【0017】脱離能を有するDNA因子とは、これらが存在し、機能する染色体DNA等から、それ自身が脱離し得る能力を有するDNA配列をいう。植物ではこのような因子として、染色体上に存在するトランスポゾンと呼ばれるものが知られており、その構造と働き、そしてその挙動もほぼ判明している。すなわち、トランスポゾンが機能するためには、原則として、その内部にある遺伝子から発現し、それ自身の脱離及び転移を触媒する酵素(転移酵素)と、やはりその内部の末端領域に存在し、この転移酵素が結合し作用するDNA配列という、2つの構成要素が必要とされる。これらの働きにより、トランスポゾンはその存在するDNA上から脱離し、その後、普通はDNA上の新たな位置に転移するが、一定の確率で転移できぬままその機能を失い、消失等する場合も生ずるので、本発明ではこのようなトランスポゾンの転移ミスを利用する。

【0018】なお、トランスポゾンには、このような自律性トランスポゾン、すなわち、転移酵素とDNA結合配列という2つの要素を保持していて、トランスポゾン内部から発現する転移酵素が末端領域に存在するDNA配列に結合して作用することにより、自律的にその存在するDNA上から脱離して転移しうるものの他、非自律性トランスポゾンと呼ばれるタイプもある。この非自律性トランスポゾンとは、転移酵素が結合し作用する末端のDNA配列は保持しているものの、内部にある転移酵素遺伝子に変異が生じており、転移酵素の発現がないため、自律的にDNA上から脱離することができないものをいうが、しかし、非自律性トランスポゾンも、自律性トランスポゾンあるいはこれとは独立して存在する転移

酵素遺伝子から転移酵素が供給されると、自律性トランスポゾンと同様の挙動を示すこととなる。

【0019】従って、本発明においては、自律性、非自律性のいずれのトランスポゾンも使用することができる。つまり、非自律性のトランスポゾンを用いる場合には、その内部に、サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子の他、自律性トランスポゾン等から取得、または合成した転移酵素遺伝子を挿入して使用すればよい。

【0020】現在、単離されている自律性トランスポゾンとしては、トウモロコシより単離されたAcとSpmがあり、詳細な解析がなされている(A. Gieri and H. Saedler, Plant Mol. Biol., 19:39, 1992)。とりわけAcは、トウモロコシの染色体中、wx-m7遺伝子座を制限酵素Sau3Aで切出すことにより得ることができる(H. Behrens et al., Mol. Gen. Genet., 194:346, 1984)、植物トランスポゾンの中では最も解析の進んでいる自律性トランスポゾンであり、そのDNAシーケンスも既に解明されているので(M. Mueller-Neumann et al., Mol. Gen. Genet., 198:19, 1984) 当業者が容易に取得可能なことから、本発明に使用するDNA因子として相応しい。また、非自律性トランスポゾンとしては、それぞれAc、Spmの内部領域が欠損したものである、DisやdSpmを始め(H.-P. Doering and P. Starlinger, Ann. Rev. Genet., 20:175, 1986) 種々のものが、トウモロコシ以外にも、キンギョソウ、アサガオ等の多くの植物から単離されている(例えば、Y. Inagaki et al., Plant Cell, 6:375, 1994)。ちなみに、これらのトランスポゾンは、その由来する植物と異なる種類の植物の染色体に導入された場合でも、その能力を発揮して脱離し、転移することが多くの例で知られている(例えば、B. Baker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:4844, 1986)。

【0021】さらに、植物以外に存在する脱離能を有するDNA因子としては、部位特異的組換え系(site-specific recombination system)に由来するものが知られている。この部位特異的組換え系は、特徴的なDNA配列を有する組換え部位(本発明の脱離能を有するDNA因子にあたる。)、及びこのDNA配列(組換え配列)に特異的に結合して、その配列が2以上存在したとき、その配列間の組換えを触媒する酵素、という2つの要素からなっており、そして、この組換え配列が同一DNA分子上に、同一方向を向いてある一定の間隔で2か所存在している場合には、これに挟まれた領域がこのDNA分子(プラスミド、染色体等)から脱離し、またこの配列が対向する方向を向いて2か所存在している場合には、この領域が反転する、という挙動を示す。本発明では、この前者の脱離作用を利用するが、このような組換え部位の脱離・反転は、部位特異的組換え系によるいわゆる相同的組換えの結果として生ずるものであり、これ

が、転移の過程としてその脱離を起こす、トランスポゾンを用いた場合の機構とまったく異なる点である。なお組換え酵素をコードする遺伝子は、必ず組換え部位と同一のDNA分子上に存在する必要はなく、これと同一細胞内に存在し、発現してさえすれば、この組換え配列間の脱離・反転を生ぜしめ得ることが知られている (N. L. Craig Annu. Rev. Genet., 22:77, 1988)。

【0022】現在、部位特異的組換え系はファージ、細菌 (例えば大腸菌)、酵母等の微生物から分離された Cre-lox 系、pSR1 系、FLP 系、cre 系、flim 系等が知られているが (総説として、N. L. Craig, Annu. Rev. Genet., 22:17, 1988)、高等生物ではまだその存在を知られていない。しかし、これらの微生物から分離された部位特異的組換え系も、P1 ファージ由来の Cre-lox 系が植物への遺伝子導入用ベクターに利用されて、植物中でもその機能を発揮するなど (国際公開 WO 93/01283 号公報)、その由来する生物種と異なる生物種 (植物を含む) に導入された場合でも、そのそもその生物内における挙動と同一の挙動をとることが知られている。ちなみに本発明の実施例 2 では、酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) の部位特異的組換え系である pSR1 系 (H. Matsuzaki et al., J. Bacteriology, 172:610, 1990) を、その組換え部位に組換え酵素を挿入して利用したが、この pSR1 系もまた、高等植物においてその本来の機能を発揮することがすでに報告されている (H. Onouchi et al., Nucleic Acid Res., 19:6373, 1991)。

【0023】また、サイトカニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子を脱離能を有する DNA 因子と組合せて使用する場合に、これらの植物ホルモン遺伝子を挿入する場所は、脱離能を有する DNA 因子と共にこれらが脱離し得る位置でなければならず、このような位置でありさえすればどこでもよい。例えば、脱離能を有する DNA 因子としてトランスポゾンを用いた場合には、転移酵素遺伝子のプロモーター領域より上流で、この転移酵素が結合する末端領域よりは下流の、トランスポゾンの脱離に影響を及ぼさない位置にこれを挿入することができる。一方、pSR1 系を用いた場合には、組換え部位に挟まれた領域内で、組換え酵素の発現を阻害しない位置でありさえすれば、これをどこにでも挿入することができる。

【0024】かかる構成のベクターを用いて植物に遺伝子を導入した場合、導入後、選抜マーカー遺伝子として用いたサイトカニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子は、脱離能を有する DNA 因子と共に、植物の染色体等、いったんはそれらが導入され機能していた DNA 上から脱離し、その頻度には差はあるものの、ある一定の確率でその機能を失う一方、これとは挙動を一つにしない目的遺伝子は、おなじ DNA 上に残留し続けることになる。それ故このベクターは、導入しようとする目的遺

伝子に関する構成を変更するのみで、ある一つの植物体へ遺伝子の多重導入を行うために、何度でも無制限に繰り返して用いることができる。しかもこれら植物ホルモン遺伝子の機能の消失は、今度は、遺伝子導入組織の培養中に起こる多芽体から正常な芽への形態変化として、遺伝子導入の際と同様に肉眼で検出できるので、目的遺伝子だけが染色体等に残留してその機能を保持している細胞のみからなる組織を、何ら特別な操作を行うことなく、その組織を培養するだけで確実・容易に選抜できることとなる。従って、これを用いた遺伝子の多重導入も、ただ何回でも繰り返せるばかりではなく、完全な植物体を再生する前の培養組織の段階でこれを繰り返せるため、効率良く行うことができる。また、かかる細胞だけからなる遺伝子導入個体を得るためには、上記のようにして選抜した組織から植物体を再生するだけでよく、交配過程を経る必要もない。そしてこのようにして得られた遺伝子導入個体はまさに、前記したような選抜マーカー遺伝子の遺伝子産物がもたらすかもしれない人体への悪影響に対する危惧から、完全に解放されたものである。加えてこのベクターは、選抜マーカー遺伝子としてサイトカニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子を用いたことから由来する他の特徴、すなわち、遺伝子導入組織の選抜過程で、細胞活性の低下を招くおそれがある細胞生長阻害物質等を用いる必要がないなどの、前述したメリットをも合わせ持つことは言うまでもない。

【0025】本発明のベクターは、遺伝子工学的手法により遺伝子導入が可能で、いかなる植物においても用いることができ、また、本発明のベクターにより植物に導入できる目的遺伝子は、農業的に優れた形質を付与できる遺伝子、農業的に優れた形質を付与するとは限らないが、遺伝子発現機構の研究に必要とされる遺伝子等、目的に応じて種々選択することができる。

【0026】なお一般に、遺伝子から酵素等のタンパク質が産生されるには、これらポリペプチドの情報をコードしている構造遺伝子配列の他に、構造遺伝子のプロモーター配列 (発現開始配列)、ターミネーター配列 (発現終結配列) などの調節配列が必要とされ、例えば、植物で機能するプロモーター配列としては、カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター (J. T. Odell et al., Nature (London), 313:810, 1985)、ノバリン合成酵素のプロモーター (W. L. R. Langridge et al., Plant Cell Rep., 4:355, 1985)、リブローズ 2 リン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ小サブユニットのプロモーター (R. Fluhr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2358, 1986) 等が、またターミネーター配列としては、ノバリン合成酵素のポリアデニル化シグナル (A. De picker et al., J. Mol. Appl. Gen., 1:561, 1982)、オクトピン合成酵素のポリアデニル化シグナル (J. Gielen et al., EMBO J., 3:835, 1984) 等が知られている。従

って、本発明において単に遺伝子とした場合には、構造遺伝子及び遺伝子発現調節配列を指すこともある。ちなみに、本発明においては、実施例で使用した遺伝子発現調節配列に限ることなく、上記のような種々の遺伝子発現調節配列を使用することができる。さらに、遺伝子、すなわちDNAは、cDNAまたはゲノムDNAのクローニングにより得ることができるが、あらかじめそのシーケンスが明らかにされているものであれば、これを化学合成して得ることもできる。

【0027】本発明のベクターは、植物に感染するウイルスや細菌を介して、植物細胞に間接的に導入することができる(I. Potrykus, Annu. Rev. Plant. physiol. Plant Mol. Biol., 42:205, 1991)。この場合、例えば、ウイルスとしては、カリフラワーモザイクウイルス、ジェミニウイルス、タバコモザイクウイルス、ブロムモザイクウイルス等が使用でき、細菌としては、A. ツメファシエンス、アグロバクテリウム・リゾジェネス等が使用できる。なおアグロバクテリウム属は、一般に単子葉植物には感染せず、双子葉植物にのみ感染するとされているが、最近では、これらを単子葉植物へ感染させて遺伝子導入を行った例も報告されている(例えば、国際公開WO94/00977号公報)。

【0028】本発明のベクターはまた、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ポリエチレングリコール法、融合法、高速バリスティックペネトレーション法等の物理的・化学的手法によっても、植物細胞に直接導入することができる(I. Potrykus, Annu. Rev. Plant. physiol. Plant Mol. Biol., 42:205, 1991)。単子葉植物の多くやアグロバクテリウムの感染しにくい双子葉植物に対しては、遺伝子導入法として汎用されているアグロバクテリウムを用いた間接導入法が使用できないため、これらの直接導入法が有効である。

【0029】

【作用】多くの植物組織において、植物体への再分化過程は、サイトカイニン、オーキシン等の植物ホルモンのよりコントロールされることが知られている。しかし、単純にオーキシンとサイトカイニンとを組合せて使用した場合には、むしろ培養組織のカルス化を招くとされていた。これは、自然界において、A. ツメファシエンスの感染により植物組織に発生するカルス様の組織(クラウンゴール)が、サイトカイニン合成遺伝子である*i p t*遺伝子及びオーキシン合成遺伝子である*i a a M/i a a H*遺伝子の発現の結果、形成されることが知られているからである。

【0030】これに対し、本発明者らは、これらの遺伝子を併用すると、むしろ、これらが導入された植物組織から不定芽が効率良く再分化することを見出した。従来からの定説と、新たに見出されたこの事実との相違の理由は定かでない。しかし、自然界において、*i p t*遺伝子及び*i a a M/i a a H*遺伝子は、必ずしもその作用

が明確にされていない他の遺伝子配列が介在した状態でA. ツメファシエンスのプラスミド上に存在している。一方、本発明においては、サイトカイニン合成遺伝子、オーキシン合成遺伝子を個々に単離し、かかる配列を介在させずにベクターを構築した。従って、このことにより、これらの遺伝子間に介在していた配列の影響が除去されて、遺伝子導入細胞のカルス化が抑制され、不定芽を形成する方向へと分化が進行したものと考えられる。

【0031】

【実施例】以下に、本発明を実施例に基づいて説明する。

【0032】[実施例1]

1. ベクターの作成

病原性A. ツメファシエンスPO22株のT-DNA

(我彦広悦、植物の化学調節、24:35、1989、(図1参照))上に存在する*i a a M/i a a H*遺伝子をPCR法にて増幅し、T4ポリメラーゼ(宝酒造(株)より購入)により末端を平滑化した後、これをプラスミドpUC18(宝酒造(株)より購入)の*S m a I*制限酵素部位に挿入して組換えプラスミドpIAMH1を得た。なお、PCR法においては、プライマーとして5'-GTGTGTTCTTGTTGCGTGCCCTTATGAGT'(iaaH Blm)と5'-CCTATAGTTTAGGCACATATGA-3'(iaaM6)との組合せを用いた。得られたプラスミドは制限酵素*B a m H I*にて切断後、その切断部位をT4ポリメラーゼにより平滑化し、この部分に5'リン酸化*K p n I*リンカー(宝酒造(株)より購入)を挿入して、プラスミドpIAMH2とした。

【0033】一方、プラスミドpUC119(宝酒造(株)製)の*S m a I*制限酵素部位に*i p t*遺伝子(Y. Ebinuma, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 211, 1997)が挿入されたプラスミドpIPT2(特開平9-154580)を*B a m H I*と*S p h I*で切断、この切断部位を上記と同様にT4ポリメラーゼにて平滑化した後、再度連結して、これをpIPTS1とした。次いで、このプラスミドpIPTS1を制限酵素*E c o R I*と*H i n d I I I*で切断し、切出された*i p t*遺伝子をpNP1128(特開平9-154580)の*E c o R I-H i n d I I I*制限酵素部位間に挿入してプラスミドpIPT8Sを得、このプラスミドの*K p n I-E c o R I*制限酵素部位間に、pUC18に挿入されていたGUS遺伝子を挿入して、プラスミドpIPNGを作成した。さらに、このプラスミドpIPNGを制限酵素*S s e I*で切断して、*i p t*遺伝子及びGUS遺伝子を含む酵母部位特異的組換え系(pSR1系)の組換え配列に挟まれた領域を切出し、これをpRZ15の*S s e I*制限酵素部位に挿入してプラスミドpRZ1NGを得た。なお、GUS遺伝子は、これを有する細胞が特殊な基質を代謝して青色の色素を生産することから、植物における遺伝子発現の解析に汎用されている遺伝子であり、この実施例

1及び実施例2では、目的遺伝子のモデルとしても用いている。

【0034】なお、pRZ15は、A. ツメファシエンズのRBサイトとLBサイトとを有する植物遺伝子導入用ベクターである。このプラスミドは、プラスミドpBI121のT-DNA領域をLBサイトのみを残して除去したプラスミド、pRZ10のSphI制限酵素部位を切断してT4ポリメラーゼにより平滑化した後、pUC18のTfII制限酵素部位に挿入されたRBサイト（化学合成により取得。）を制限酵素HaeIIIにて切出し、その切断末端を同様に平滑化して連結することにより得られたプラスミドについて、EcoRI、HindIII制限酵素による切断、T4ポリメラーゼによる平滑化、再連結を行い作成されたものである。かかる構成のプラスミドを有するA. ツメファシエンスを植物に感染させた場合、その構造のうち、RBサイトとLBサイトの内側の領域（T-DNA領域）が植物染色体中に組込まれることとなる。

【0035】本発明のベクター、即ちサイトカイニン合成遺伝子（ipt遺伝子）及びオーキシン合成遺伝子（iaaM/iaaH遺伝子）を含むプラスミドは、プラスミドpIAMH2から制限酵素KpnIにて切出されたiaaM/iaaH遺伝子を、プラスミドpRZ1NGのKpnI制限酵素部位に挿入することにより得られ、このプラスミドはpIPMHと命名された。

【0036】なお、このプラスミドpIPMHは、大腸菌（*Escherichia coli*）HB101株に導入し、この大腸菌をE. coli HB101 pIPMHとして国内寄託に付した（受託番号：FERM P-16879）。

【0037】pIPMHの作成スキムを図1から図6に、pRZ15の作成スキムを図7から図9に示す。図中の丸で囲んだP、Tは、それぞれipt遺伝子及びiaaM/iaaH遺伝子自身のプロモーター及びポリアダニル化シグナルを示し、35S-Pはカリフラワーモザイクウィルスの35Sプロモーターを、NOS-Pはノバリンシンセターゼ遺伝子のプロモーターを、NOS-Tはノバリンシンセターゼ遺伝子のポリアダニル化シグナルを示す。また、網かけした三角形は酵母の部位特異的組換え系の組換え配列RSとその配列方向を、小さな黒三角形はそれぞれRBサイトとLBサイトとを表し、Km<sup>r</sup>はカナマイシン耐性遺伝子を示す。

【0038】11. アグロバクテリウムへのpIPMHの導入

A. ツメファシエンスLBA4404株（CLONTECH社より購入）を、10mlのYEB液体培地（ビーフエキス5g/l、酵母エキス1g/l、ペプトン1g/l、ショ糖5g/l、2mM MgSO<sub>4</sub>、22℃でのpH7.2（以下、特に示さない場合は22℃でのpHとする。））に接種し、OD<sub>630</sub>が0.4から0.6

の範囲に至るまで、28℃で培養した。この培養液を、6900×g、4℃、10分間遠心して集菌した後、菌体を20mlの10mM HEPES（pH8.0）に懸濁して、再度6900×g、4℃、10分間遠心して集菌し、得られた菌体を200μlのYEB液体培地に懸濁して、これをプラスミド導入用菌液とした。

【0039】アグロバクテリウム菌体へのプラスミドpIPMHの導入は、このようにして調整されたプラスミド導入用菌液50μlとIで作成したプラスミドpIPMH3μlとを0.5mlチューブ（アシスト社製）内で混合し、この混合液をエレクトロポレーション法（ジーンパルサーIIシステム（BIO-RAD社製））に供することにより行った。エレクトロポレーション後は、この混合液に200μlのYEB液体培地を加えて25℃で1時間振とう培養し、得られた菌体を50mg/lカナマイシン添加YEB寒天培地（寒天1.5w/v%、他の組成は上記に同じ。）に播種して更に28℃で2日間培養を続け、A. ツメファシエンスの菌コロニーを形成させた。アグロバクテリウム菌体へのプラスミドpIPMHの導入は、このコロニーを対象として確認した。即ち、形成された菌コロニーをYEB液体培地に移植して菌体を増殖させた後、この菌体からアルカリ法でプラスミドを抽出し、これを制限酵素SseI及びKpnIを用いて切断して、得られたそのDNA断片をアガロースゲル電気泳動にて分析することにより確認を行った。

【0040】111-1. アグロバクテリウムからタバコへのpIPMHの導入

温室内で育成させたタバコ（*Nicotiana tabacum* (L.) cv. Petit Havana SR-1、特に記載する場合を除き、以下同じ。）の成葉を、1w/v%次亜塩素酸ナトリウム水溶液に5分間浸漬して殺菌し、滅菌水で3回洗浄した後、中脈を取り除き、コルクローラーを用いて直径約6mmの葉片となるよう調整した。このタバコ葉片40個を、IIにおいてプラスミドpIPMHを導入したA. ツメファシエンスLBA4404株の菌液（OD<sub>630</sub>=0.25、YEB液体培地にて一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。）に約1分間浸してこれに感染させた後、滅菌した濾紙の上に置いて余分な菌体を除いてから、アセトシリゴン50mg/lを添加した植物ホルモンを含まない（ホルモンフリー）MS寒天培地（T. Murashige and F. Skoog, Physiol. Plant., 15:473, 1962、但し、寒天0.8w/v%を添加。）に、葉の裏が上になるように置床した。これを25℃、暗所で2日間培養後、ティカルシン500mg/lを含むホルモンフリーMS寒天培地に移植して、25℃、全明（約2500lux（以下同じ。））の条件で培養を行った結果、A. ツメファシエンスの感染後約30日目不定芽40個を得ることができた。

【0041】111-2. アグロバクテリウムからトマ



トへのpIPMHの導入

フラスコ内で無菌的に生育したトマト (*Lycopersicon lycopersicum* var Ailsa Craig、特に記載する場合を除き、以下同じ。) の直径2mm以上の莖を約1cm長さで切出し、この莖切片20個を、IIにおいてプラスミドpIPMHを導入したA. ツメファシエンシスLB4404株の菌液 (OD<sub>600</sub> = 0.1、YEB液体培地にて一夜培養後、滅菌水で希釈して菌体濃度を調整。) に約1分間浸してこれに感染させた後、III-1と同様に培養した結果、A. ツメファシエンシス感染後約30日目まで不定芽6個を得ることができた。

【0042】III-3. アグロバクテリウムからヤマナラシへのpIPMHの導入

フラスコ内で無菌的に生育したヤマナラシ (*Populus si ebollidi* x *Populus grandidentata* Y63 clone、秋田十條化成(株)内実験林より採種、特に記載する場合を除き、以下同じ。) の莖を、節を含まないように約5mm長さで切出し、III-2と同様にして、この莖切片20個にA. ツメファシエンシスLB4404株を感染させ、また、感染後の莖を培養した。その結果、A. ツメファシエンシス感染後約30日目まで不定芽6個を得ることができた。

【0043】IV. 遺伝子導入を行ったタバコの解析

III-1で得られた不定芽を切出し、これらをティカルシン500mg/lを含むホルモンフリーMS寒天培地に置床して、25℃、全明の条件で培養を行なったところ、培養1ヶ月後、30個の不定芽から多芽体の形成が観察された。さらに、こうして形成された多芽体の株のうち25株からGUS遺伝子の発現が検出され、これらの多芽体が、プラスミドpIPMHによる遺伝子導入の結果生じたものであることが確認された。

【0044】【比較例1】

I. pRZINGのアグロバクテリウムへの導入、並びに、アグロバクテリウムからタバコ、トマト及びヤマナラシへの導入

実施例1のIで作成し、植物ホルモン遺伝子としてipL遺伝子のみを含むプラスミドpRZINGを、実施例1のII、IIIと同様に、A. ツメファシエンシスLB4404株に導入し、このA. ツメファシエンシスをタバコ、トマト及びヤマナラシに感染させ、これらの感染組織をそれぞれ培養した。その結果、感染後30日目までタバコについては葉片40個より不定芽32個、トマトについては莖切片20個より不定芽1個が得られたが、ヤマナラシについては同じ培養期間内に莖切片20個より不定芽を得ることはできなかった。

【0045】II. 遺伝子導入を行ったタバコの解析

Iで得られたタバコの不定芽を切出し、これらをティカルシン500mg/lを含むホルモンフリーMS寒天培地に置床して、25℃、全明の条件で培養を行なったところ、培養1ヶ月後、23個の不定芽から多芽体の形

成が観察された。さらに、こうして形成された多芽体の株のうち15株からGUS遺伝子の発現が検出され、これらの多芽体が、プラスミドpRZINGによる遺伝子導入の結果生じたものであることが確認された。

【0046】【実施例2】

I. ベクターの作成

プラスミドpNP1302 (国際公開WO97 42334号公報) から、制限酵素HindIII、EcoRIを用い、酵母の部位特異的組換え系 (pSR1系) の組換え酵素遺伝子 (R遺伝子) を、これに連結されたグルタチオン-S-トランスフェラーゼII系遺伝子プロモーター (GST-IIプロモーター、国際公開WO93/01294号公報) の主領域2.5Kb及びノバリンシンセターゼ遺伝子のポリアデニル化シグナルと共に切出して、プラスミドpUC18のHindIII-EcoRI制限酵素部位間に挿入することにより、組換えプラスミドpNP1302-2を得た。

【0047】次いで、このプラスミドを制限酵素EcoRIで切断し、T4ポリメラーゼによりその切断末端を平滑化した後、この部分に5'リン酸化HindIIIリンカー (宝酒造(株)より購入) を挿入してプラスミドpNP1303-3を作成、そしてこのプラスミドをHindIIIで切断し、再びGST-IIプロモーター、R遺伝子及びノバリンシンセターゼ遺伝子のポリアデニル化シグナルを切出して、これをプラスミドpIPT8S (実施例1のIで作成。) のHindIII制限酵素部位に挿入することによりプラスミドpIPGRを得た。さらに、このプラスミドのKpnI制限酵素部位に、pIAMH2 (実施例1のIで作成。) より制限酵素KpnIで切出したiaaM/iaaH遺伝子を挿入し、pIPMHGRを作成した。

【0048】本発明のもう一つの態様のベクター、即ち、サイトカニン合成遺伝子 (ipt遺伝子) 及びオーキシン合成遺伝子 (iaaM/iaaH遺伝子) と脱離能を有するDNA因子 (pSR1系に由来するDNA因子) とを含み、サイトカニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子が、脱離能を有するDNA因子と共に挙動する位置に配置されたプラスミドは、このプラスミドpIPMHGRから制限酵素SseIにより、pSR1系の組換え配列に挟まれた領域を切出し、これをpRZ11 (実施例1のIで作成。) にGUS遺伝子が導入されたプラスミド、pRZ16のSseI制限酵素部位に挿入することにより得られ、このプラスミドはpMATIMHと命名された。

【0049】なお、このプラスミドpMATIMHは、大腸菌 (*Escherichia coli*) HB101株に導入し、この大腸菌をE. coli HB101 pMATIMHとして国内寄託に付した (受託番号: FERM P-16878)。

【0050】pMATIMH及びpRZ16の作成スキ

ムを図10から図13及び図14に示す。図中、GST-PはGST-11プロモーターのHindIII制限酵素部位以下2.5Kbの領域を示す。GST-11プロモーターは、除草剤解毒性に関与するGSTのアイソザイムのうちの1つ、GST-11をコードする遺伝子のプロモーターであって、GST-Pは、このGST-11プロモーターと同様、除草剤解毒剤、例えば2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジンや、その類縁体等の化学物質の存在下、GST-11活性を劇的に上昇させる。なお、他の符号については図1から図9で用いられているものと同様の意味を示す。

#### 【0051】11. タバコへのpMATIMHの導入及びpMATIMH導入タバコの解析

上記Iで作成したプラスミドpMATIMHを、実施例1の11、111と同様にして、A.ツメファシエンスLBA4404株に導入し、このA.ツメファシエンスをタバコ葉片20個に感染させて、これらの葉片を培養した。A.ツメファシエンスの感染から30日後、不定芽20個が生じたので、これらを切出してティカルシリン500mg/lを含むホルモンフリーMS寒天培地に置床して、25℃、全明の条件で培養を行なったところ、培養1ヶ月後に12個の不定芽から多芽体の形成が観察され、GUS遺伝子の発現によって、これらの多芽体がpMATIMHによる遺伝子導入の結果生じたものであることが確認された。

【0052】こうして形成された多芽体12株は、更に、ティカルシリン500mg/lと2,2,5-トリメチル-3-(ジクロロアセチル)-1,3-オキサゾリジン30mg/lを含むホルモンフリーMS寒天培地に置床して培養を行なった。その結果、A.ツメファシエンスの感染から12ヶ月後までには、これら12株のうち6株から、肉眼で明らかに多芽体と識別できる正常な形態を示すシュートが分化し、これらのシュートについては、PCR分析により選抜マーカー遺伝子の脱離が、また、サザン分析によりGUS遺伝子の存在が検出された。即ち、これらのシュートの染色体からは選抜マーカー遺伝子が脱離して消失し、目的遺伝子(GUS遺伝子)のみがその染色体上に残留していることが確認された。

#### 【0053】

【発明の効果】本発明のベクターは、選抜マーカー遺伝子として、サイトカイニン合成遺伝子とオーキシン合成遺伝子を使用したものである。このため、これを用いて植物への遺伝子導入を行った場合、目的遺伝子導入組織の選抜にあたっては、通常の培養条件で培養し、選抜マーカー遺伝子の効果により生じてくる多芽体を肉眼により識別するだけでよく、また、選抜のため化学物質等を培地中へ添加する必要がないため、その選抜中に植物細胞の活性低下を招くおそれもない。

【0054】また、かかる選抜マーカー遺伝子は、植物が本来保持しているか、あるいは細菌等の感染により植物に自然に導入されてきた遺伝子であるため、かかる遺伝子が遺伝子導入を行った植物細胞内で発現していても、これを食用等に供した場合の人体への安全性に対しては、かなり信頼することができる。

【0055】しかも、本発明のベクターによれば、選抜マーカー遺伝子であるサイトカイニン合成遺伝子とオーキシン合成遺伝子の働きによって、このベクターを用いて遺伝子が導入された植物組織の再分化効率が上昇する。従って、多くの植物種において、外生の植物ホルモンを付与しなくとも、目的遺伝子が導入された植物個体等の効率的な取得が可能となる。その上、この効果は、通常は再分化が困難とされる植物種においても達成される。

【0056】加えて、このベクターにおいて、脱離能を有するDNA因子をその構成に加え、サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子をこの脱離能を有するDNA因子と挙動を一つにする位置に組込むことにより、サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子は、植物細胞への遺伝子導入後に一定の確率で、かかるDNA因子と共に、その存在し機能するDNA上から脱離して機能を失い、同時に導入された、これらとは挙動を一つにしない位置に存在する目的遺伝子のみが、同じDNA上に発現可能な状態で残留することとなる。このため、このような構成をとった場合、このベクターは、導入しようとする目的遺伝子に関する部分を変更するのみで、選抜マーカー遺伝子(サイトカイニン合成遺伝子及びオーキシン合成遺伝子)を始めとする他の構成に何らの変更をも加えることなく、ある一つの植物体へ遺伝子の多重導入を行うために、何度でも無制限に繰り返して用いることができる。

【0057】そしてこの場合も、選抜マーカー遺伝子の機能の消失は、遺伝子導入の際と同様に、遺伝子導入組織の形態の変化として肉眼で検出できるので、目的遺伝子のみが染色体等に残留してその機能を保持している細胞だけからなる組織を、確實・容易に選抜できることとなる。従って、遺伝子の多重導入も効率良く行え、また、かかる細胞だけからなる遺伝子導入個体、すなわち選抜マーカー遺伝子の影響が排除され、その遺伝子産物がもたらす危惧から完全に解放された個体も、交配過程を経ることなく得ることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】p1PMH作成スキムのうち、p1AMH2の作成までを示す図である。

【図2】p1PMH作成スキムのうち、p1PT2からp1PTS1の作成までを示す図である。

【図3】p1PMH作成スキムのうち、p1PTS1からp1PT8Sの作成までを示す図である。

【図4】p1PMH作成スキムのうち、p1PT8Sか

らpIPNGの作成までを示す図である。

【図5】pIPMH作成スキムのうち、pIPNG及びpRZ15からpRZ1NGの作成までを示す図である。

【図6】pIPMH作成スキムのうち、pRZ1NG及びpIAMH2からpIPMHの完成までを示す図である。

【図7】pRZ15作成スキムのうち、pRBpUCの作成までを示す図である。

【図8】pRZ15作成スキムのうち、pB121及びpRBpUCからpRZ11の作成までを示す図である。

【図9】pRZ15作成スキムのうち、pRZ11から

pRZ15の完成までを示す図である。

【図10】pMATIMH作成スキムのうち、pNP1302-2の作成までを示す図である。

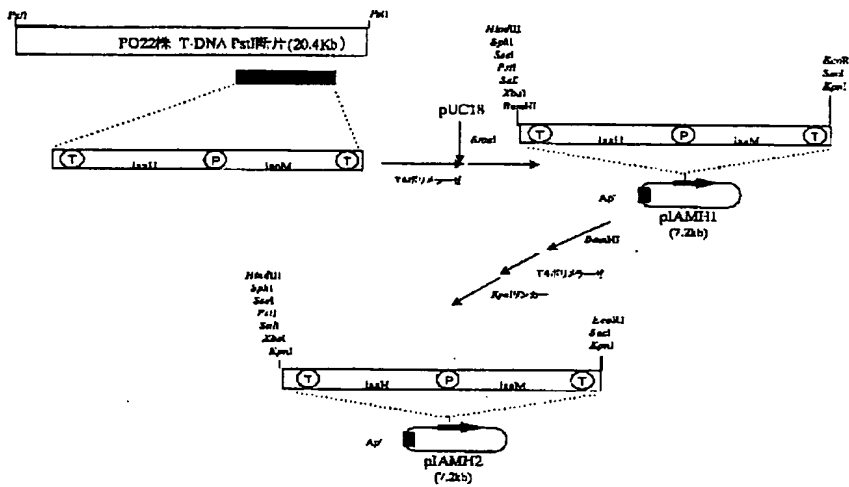
【図11】pMATIMH作成スキムのうち、pNP1302-2からpIPGRの作成までを示す図である。

【図12】pMATIMH作成スキムのうち、pIPGR及びpIAMH2からpIPMHGRの作成までを示す図である。

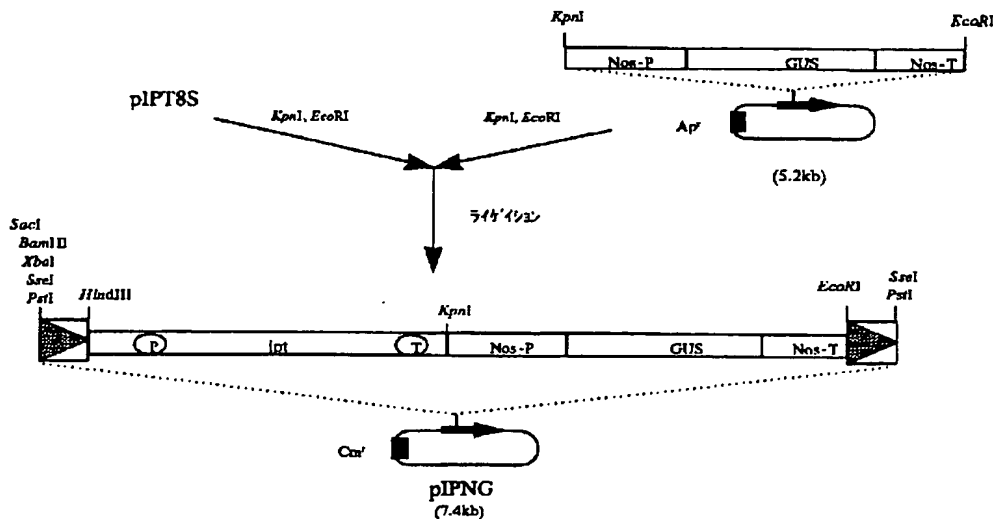
【図13】pMATIMH作成スキムのうち、pIPMHGR及びpRZ16からpMATIMHの完成までを示す図である。

【図14】pRZ16の作成スキムである。

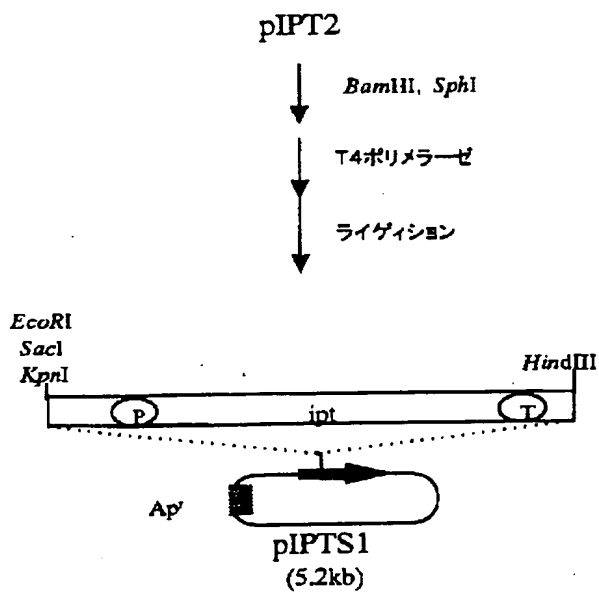
【図1】



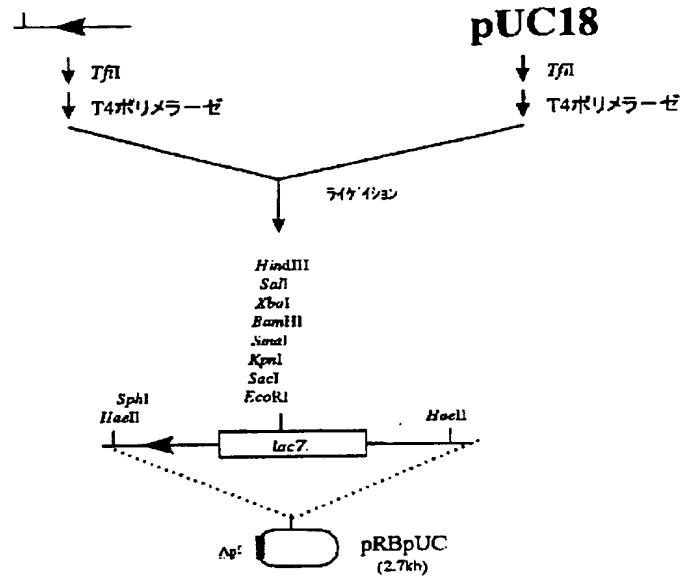
【図4】



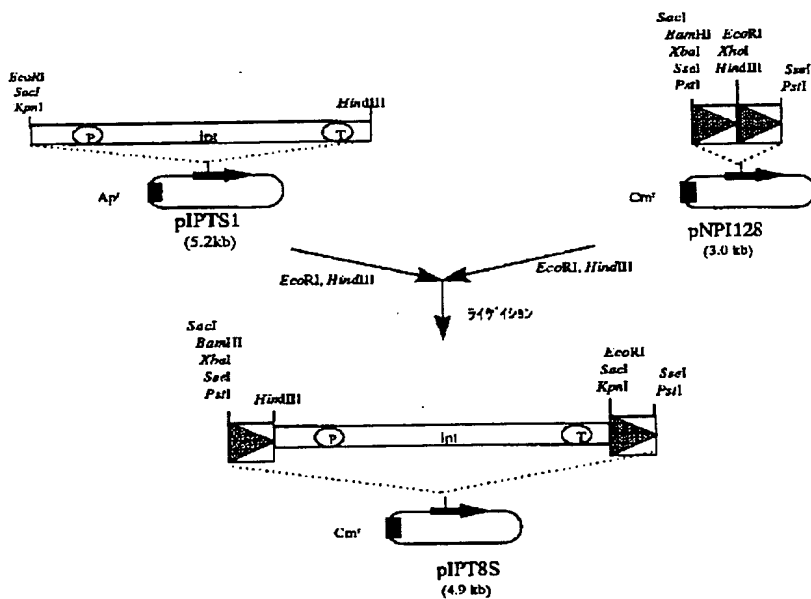
【図2】



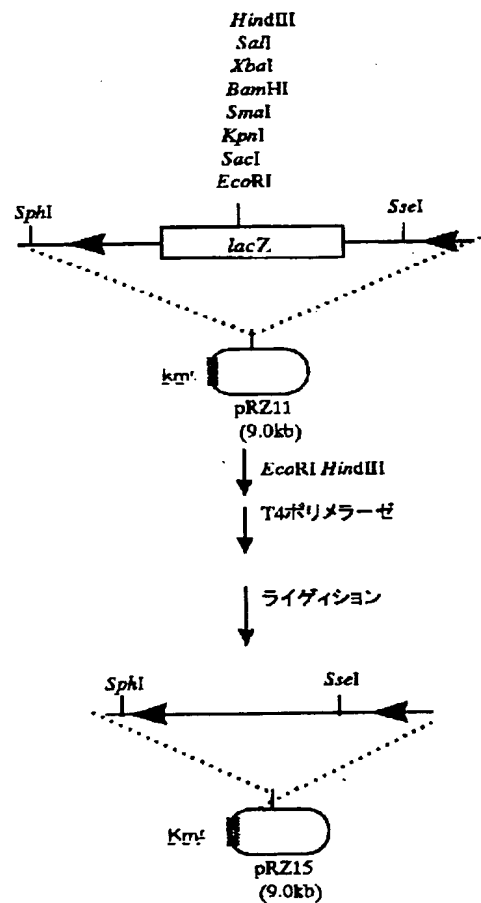
【図7】



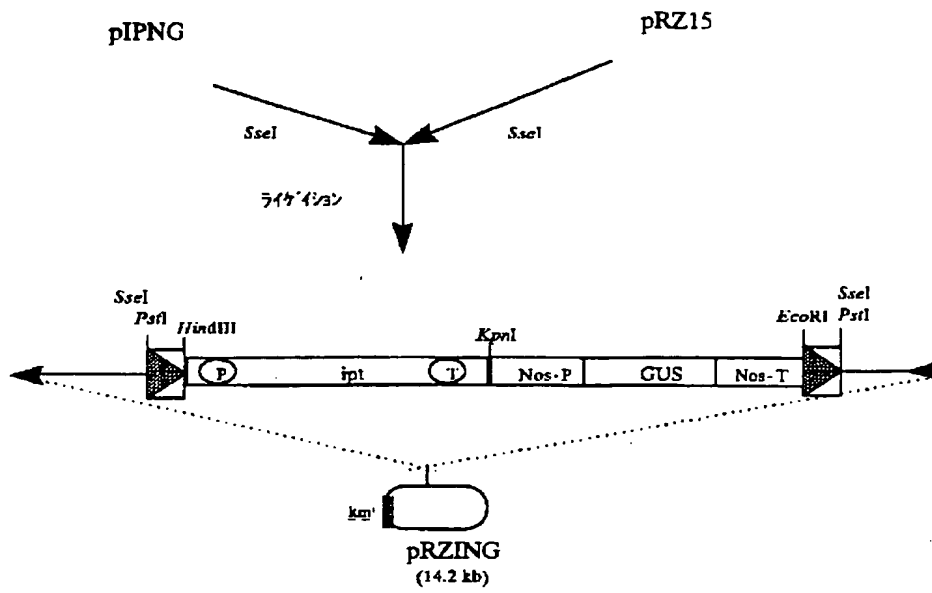
【図3】



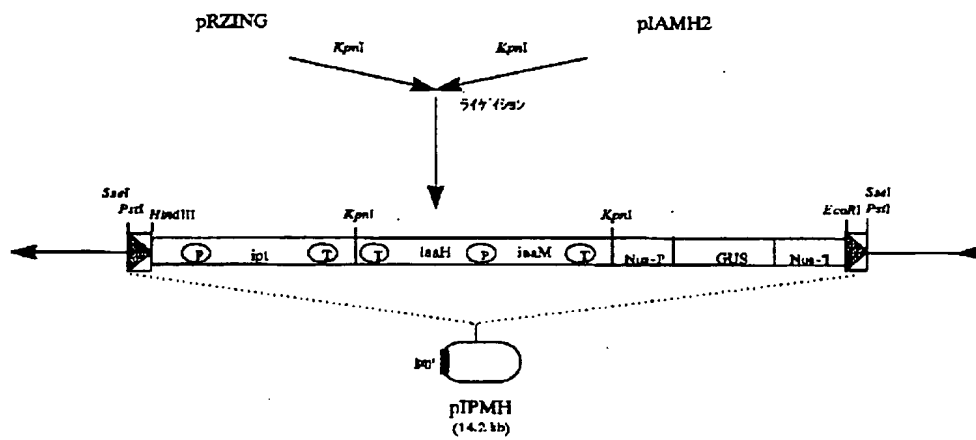
【図9】

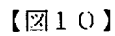


【図5】

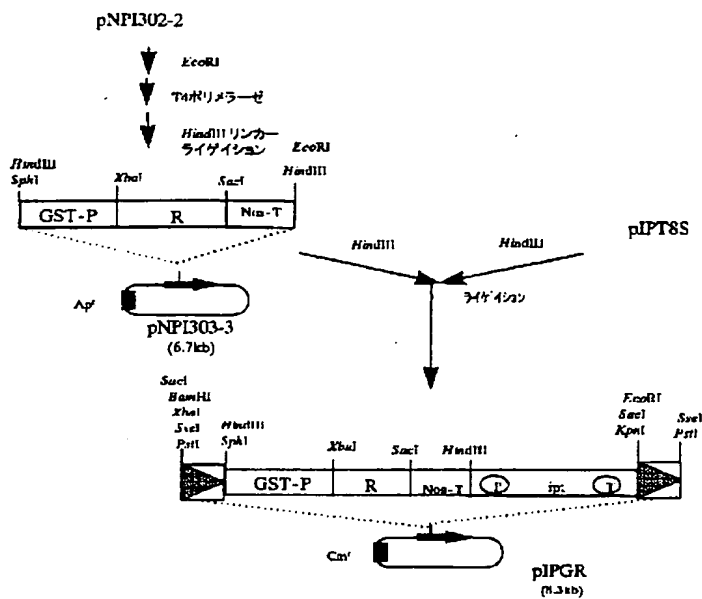


【図6】

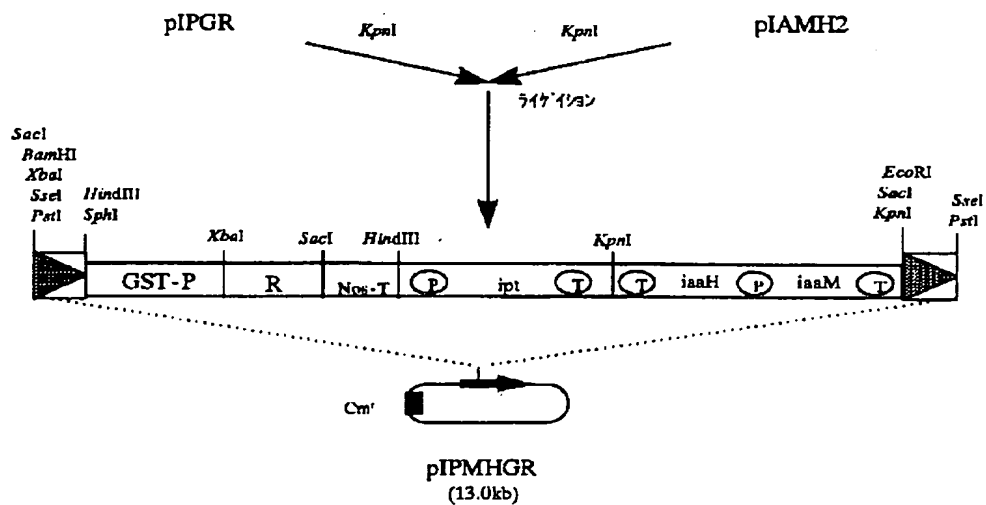




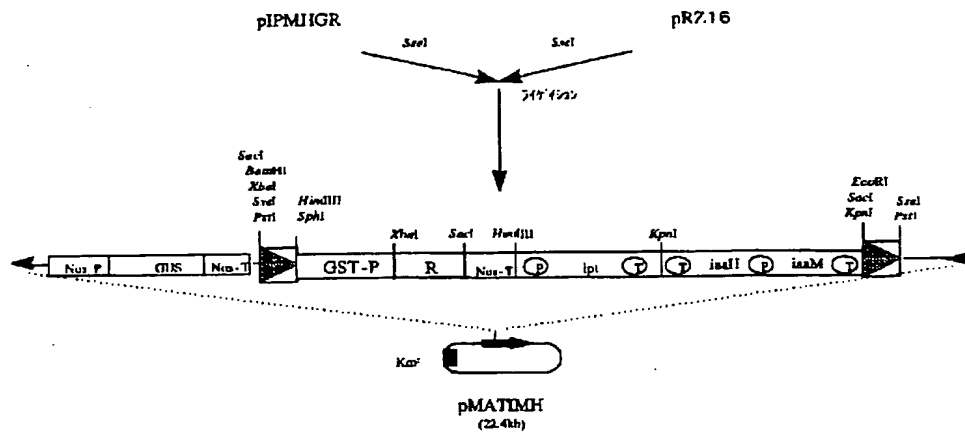
【図11】



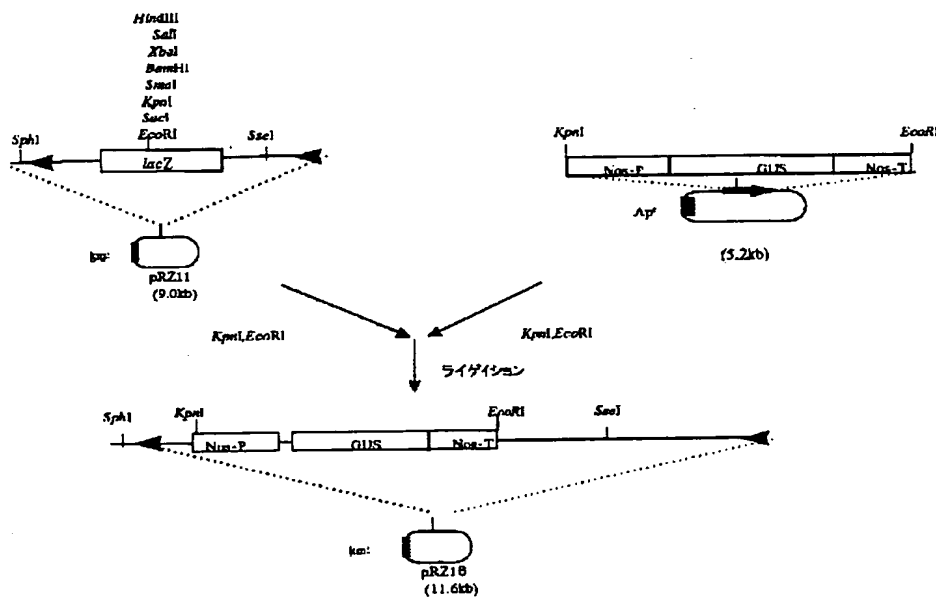
【図12】



【図13】



【図14】



フロントページの続き

(72)発明者 杉田 耕一  
東京都北区王子5丁目21番1号 日本製紙  
株式会社中央研究所内

(72)発明者 海老沼 宏安  
東京都北区王子5丁目21番1号 日本製紙  
株式会社中央研究所内